

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-343478

(43)Date of publication of application : 20.12.1994

(51)Int.Cl.

C12N 15/89  
C12M 1/00  
C12N 5/00

(21)Application number : 05-137246

(71)Applicant : HITACHI LTD

(22)Date of filing : 08.06.1993

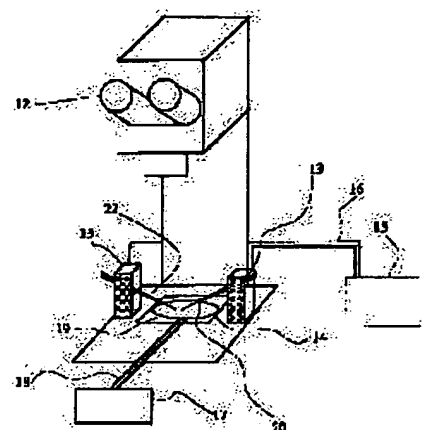
(72)Inventor : UCHIDA NORITAKA  
SASAKI YUJI

## (54) MICRO-INJECTION METHOD AND APPARATUS

## (57)Abstract:

**PURPOSE:** To surely inject an extraneous substance into a cell while suppressing the damage on the cell using a micro-injection apparatus for injecting a substance into a biotissue or cell.

**CONSTITUTION:** A plate 10 holding regularly arranged cells is placed on a micromanipulation stage and a needle 20 fixed to a fine-adjustment positioning apparatus 13 is approached to a cell 11 and slowly inserted into the cell while observing the cell with a stereo-microscope 14. A substance to be injected into the cell is preparatorily applied to the tip of the needle by electrodeposition. A needle 22 different from the needle coated with the injection substance is inserted into the cell at a side opposite to the coated needle and a voltage is applied between the needles with a power source 15. The injection substance fixed to the needle by electrodeposition is actively released into the cell by this process.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-343478

(43) 公開日 平成6年(1994)12月20日

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/89				
C 1 2 M 1/00	A			
C 1 2 N 5/00		8412-4B		
		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
		8412-4B	5/ 00	A
審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 5 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平5-137246

(22) 出願日 平成5年(1993)6月8日

(71) 出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72) 発明者 内田 憲孝

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会

社日立製作所基礎研究所内

(72) 発明者 佐々木 裕次

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会

社日立製作所基礎研究所内

(74) 代理人 弁理士 小川 勝男

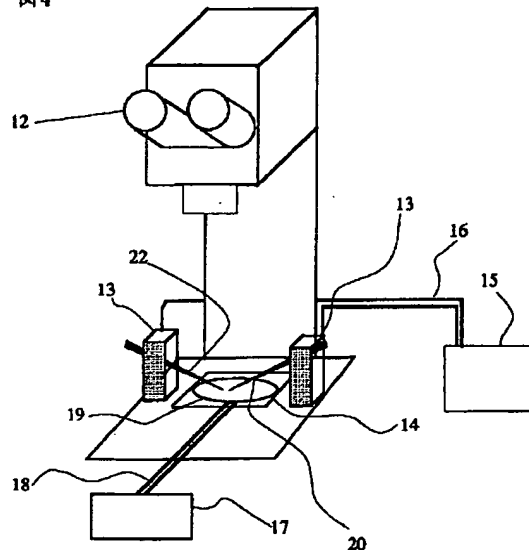
(54) 【発明の名称】 マイクロインジェクション方法及び装置

(57) 【要約】

【構成】 細胞を規則正しく配列させたプレート10を微動ステージに置き、実体顕微鏡14で観察しながら、微動な動作が可能な位置決め装置13に固定した針20を細胞11に近づけゆっくりと挿入する。針の先にはあらかじめ細胞に注入したい物質を電着法により塗布しておく。注入したい物質を塗布した針とは別の針22を最初の針の反対側から挿入し、両方の針の間に電源15から電圧を加えることにより電着固定した注入したい物質を針から能動的に細胞内に開放する。

【効果】 生体組織や細胞に物質を注入するマイクロインジェクション装置において、細胞に対するダメージを軽減し確実に外来物質を注入することができる。

図4



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】針の先端に核酸、蛋白質、その他生理活性物質を塗布し、その針を細胞または微細な組織の目的部分に差し込むことで目的部分に物質を導入することを特徴とするマイクロインジェクション方法。

【請求項2】先端に核酸、蛋白質、その他生理活性物質を塗布された針、前記針に対向した位置に配置され核酸、蛋白質、その他生理活性物質を収納した容器、前記針を前記容器内の細胞または微細な組織の目的部分に差し込む為の手段よりなることを特徴とするマイクロインジェクション装置。

【請求項3】前記針を冷却することで針表面に注入物質を凍結させて固定することを特徴とする請求項2記載のマイクロインジェクション装置。

【請求項4】上記針に電着によって針表面に注入物質を固定することを特徴とする請求項2記載のマイクロインジェクション装置。

【請求項5】上記針を複数個備えたことを特徴とする請求項2記載のマイクロインジェクション装置。

【請求項6】上記針の先端に微小な窪みを設けたことを特徴とする請求項2ないし5のいずれかに記載のマイクロインジェクション装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、生体組織及び細胞内に物質を注入するためのマイクロインジェクション方法およびその装置に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】従来、物理的機械的操作によって遺伝子や蛋白質、生理活性物質を生体組織や細胞に注入したり、生体組織や細胞から物質を取り出して検出する手法としてガラス針を細胞及び組織にさして物質を注入する機械式マイクロインジェクション装置（例えば実験生物学講座8、細胞生物学、P277-297「マイクロマニピュレーション」丸善（株）、特開平3-119989「微小インジェクション装置及びそのインジェクションの制御方法」参照）がある。また物質を注入する手法としては、電気パルスを加えることによって細胞膜に穴を開けるエレクトロポレーション（例えばNeumannらによるマウス細胞へのチミジンキナーゼ遺伝子の導入に関する実験例（Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., Hofschneider, P.H. : EMBO J., 1, 841-845 (1982)）参照）や、レーザによって細胞膜に穴を開けるレーザマイクロインジェクション（例えば「レーザ式セルプロセスによる遺伝子導入」植物細胞工学, Vol.3 No.2 (1991) 135-138参照）、さらには、微細な粒子に物質を塗布して組織あるいは細胞に打ち込むパーティクルガン（例えば「パーティクルガンによる植物細胞への遺伝子の導入と発現」植物細胞工学, Vol.2 No.5 (1991) 631-637参照）等がある。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】従来行なわれていた機械式マイクロインジェクションでは、特定の細胞に物質を注入することができるが、注入する針として中空状のガラスキャピラリーを用いていたためその外径を小さくすることには限界があった。そのために細胞に針を注入した際に細胞が破裂したり致命的なダメージを受けてしまう、操作が煩雑であるなどの問題点があった。また、エレクトロポレーションやレーザマイクロインジェクション、パーティクルガンでは一度に大量の細胞に物質を注入できるが、特定の細胞だけに物質を注入することは困難であった。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明の目的は、特定の細胞あるいは複数の細胞にできるだけダメージが少なく物質を注入する方法を提供することにある。

【0005】上記課題を解決するためには、針先に物質を塗布しその物質を針先に保持したまま細胞内に注入し、細胞内の目的の位置で物質を針先から開放することによって達成される。

## 【0006】

【作用】本発明では、針表面に注入したい物質を保持するため、細胞内に物質を注入する際に用いる針を従来用いていたものよりも細くすることができる。その結果、細胞への針注入時における細胞膜での穴は小さくなり細胞にたいするダメージを軽減し、細胞破壊が少なくなる。

## 【0007】

【実施例】本発明の第1の実施例を図を用いて説明する。

【0008】図1に本実施例を行なうための全体の構成図を示す。図2は針部分が組織に挿入されたときの拡大模式図である。図中1はXYステージ、2は針支持台、3はZ方向ステージ、4は倒立顕微鏡、5はシャーレ、6は生物組織を収納したシャーレ、7は針、8は生体組織である。次に本装置の動作を説明する。生体組織はシャーレ5の中に固定する。固定の方法は寒天やゼラチン上に押しつけることにより可能である。生体組織を固定したシャーレ5の下部からは顕微鏡によって生体組織の観察が可能である。

【0009】生体組織を固定したシャーレをXYステージの定位置に固定する。次に針支持台に固定された針の先端をシャーレ6の中の溶液、例えばDNAを含む溶液に浸し、針の先端部分に組織内に注入したい物質を塗布し、乾燥する。針7の先端部分での物質の固定法は、溶液を針先端部分で凍結したり電気を流すことによって固定する電着法を用いてもよい。続いて針7を倒立顕微鏡で観察しながら所望の生体組織の上部に配置しZ方向ステージ3によって静かに針7を降ろして、図2で示すように生体組織に差し込む。差し込む深度は対象となる組織に

よって異なる。注入したい物質が細胞に拡散した後、続いて針を元の位置まで引き上げ、再び前述の方法で針の先端部分に溶液を塗布し針7を組織のへ差し込む。

【0010】以上の操作を繰り返し、組織の異なる部分に順次針を注入することで多数の細胞に外来物質を注入することが出来る。

【0011】本装置で用いる針の作成に関しては、例えば線径25から50ミクロンのタングステンのワイヤーを電解研磨法によって作成する。この方法によれば数百オングストロームの径の細さの針を作成することができる。また、針の先端に窪みを設けることで注入したい物質をより多く針に保持させることができる。

【0012】第2の実施例を図を用いて説明する。本実施例では個々の細胞に確実に外来物質の注入を行なう方法を示す。図3(a)は細胞を固定するためのプレートの全体図。図3(b)はプレートの一部の正面図、図3(c)はプレートの一部の断面図である。図4は本実施例の模式図、図5はプレートを固定するホルダーの模式図、図6は要部の拡大図である。

【0013】細胞を固定するプレート9は単結晶シリコンウエハを異方性エッチングすることで得られる。本プレートでは細胞11を固定する細胞保持孔10がすりばち状で、底面に一辺約5ミクロンの正方形の穴が開いており裏面まで通じている。まず、プレートへの細胞の固定の方法を図5を用いて説明する。プレート9をプレートホルダー19に固定する。プレートは緩衝液21に浸してあり、プレートの裏面から吸引装置17によって強く吸引されている。吸引された液はシリコンチューブ18を通して再びプレートホルダー19に戻る。プレート9上に細胞懸濁液をまくと、細胞は1個1個細胞保持孔10に固定される。実体顕微鏡12で細胞が固定されたことを確認した後、余分な細胞を洗い流す。次にこのプレートホルダー19をXYステージ14に固定する。

【0014】動作について図4を用いて説明する。これらの細胞に微動な動作が可能な位置決め装置13に固定された針20を実体顕微鏡12で観察しながら細胞に近づけゆっくりと挿入する。ここでは直径25ミクロンの\*

\* タングステンワイヤーを電解研磨法によって作製した直径が0.5ミクロン以下の針を用いる。針の先にはあらかじめ細胞に注入したい物質を電着法により塗布しておく。次に図5に示すように注入したい物質を塗布した針20とは別の針22を最初の針の反対側から挿入し、両方の針の間に電源15からリード線16により電圧を加えることにより針20に電着固定されていた注入したい物質を針20から能動的に細胞内に開放する。

【0015】次に細胞から針をゆっくりと抜き、一方の針に再び導入したい物質を塗布し、次の細胞に同様の操作を行なう。多数の細胞に同時に確実に外来物質の注入を行ないたいときは、上記プレート上に細胞を固定し、固定した細胞に対応したピッチで規則正しく並べた針をそれぞれの細胞に注入することによって実現できる。

【0016】

【発明の効果】以上説明したように、本発明によれば細胞に対するダメージを軽減することができるので、特定の細胞に物質を注入する際の成功の確立を向上することができる。

20 【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1の全体を示す模式図。

【図2】実施例1の要部を示す模式図。

【図3】(a)、(b)および(c)は実施例2で用いる細胞固定用プレートの模式図、細胞固定用プレートの正面図および細胞固定用プレートの断面図。

【図4】実施例2の全体を示す模式図。

【図5】実施例2の要部を示す模式図。

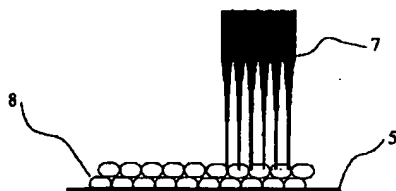
【図6】実施例2の要部の拡大図である。

【符号の説明】

30 1…XYステージ、2…針支持台、3…Z方向ステージ、4…倒立顕微鏡、5…シャーレ、6…生物組織を収納したシャーレ、7…針、8…生体組織、9…プレート、10…細胞保持孔、11…細胞、12…実体顕微鏡、13…微動な動作が可能な位置決め装置、14…XYステージ、15…電源、16…ワイヤー、17…吸引装置、18…シリコンチューブ、19…プレートホルダー、20…針、21…緩衝液、22…針。

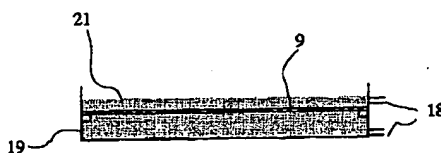
【図2】

図2



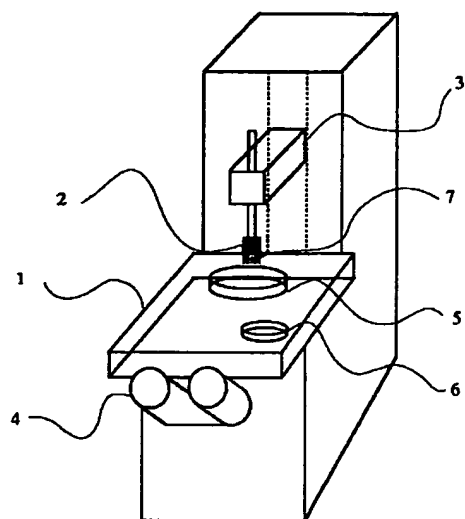
【図5】

図5



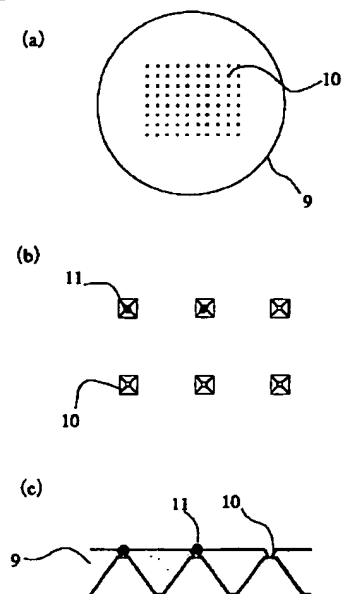
【図1】

図1



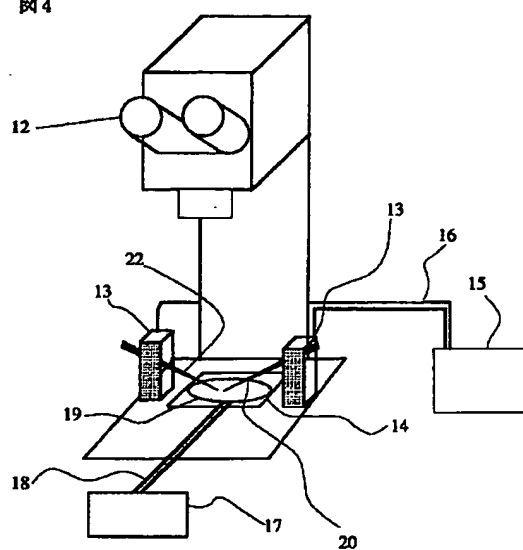
【図3】

図3



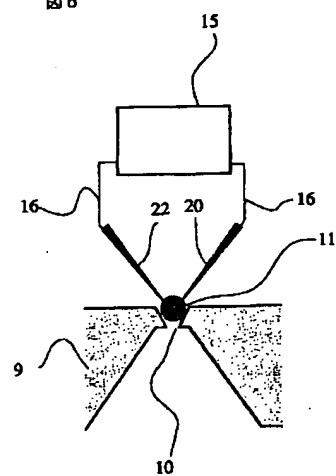
【図4】

図4



【図6】

図6



(5)

特開平6-343478

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

識別記号

片内整理番号

F I

技術表示箇所

8412-4B

C 1 2 N 5/00

D